

明 細 書

発明の名称：

遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型及び遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型ワクチンに関する。

背景技術

[0002] ヒト単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus、HSV) はヒトに広く蔓延している病原体である。dsDNA virusであるHSVはアルファヘルペスウイルス亜科に属し、HSV-1とHSV-2という二つの血清型が存在する。HSVはヒトに脳炎、髄膜炎、口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、角膜ヘルペス、全身性の新生児ヘルペス等多様な疾患を引き起こす。このようにHSVは医療衛生上極めて重要なウイルスであり、実際にアシクロビル又はバラシクロビル等の抗ウイルス剤が開発されている。

[0003] しかしながら、これまでに開発されている抗HSV剤はウイルスDNAの複製を阻害するものであるため、DNAの状態で神経節内部に潜伏感染しているHSVに対する効果は限定的である。休薬、減薬又は飲み忘れ等により服用時期を逃すと治療効果が下がる恐れがあり、根本的な疾患制御ができていない。このような状況を打破するためには、初感染及び回帰発症の予防に有効性を示し、且つ安全性の高いワクチンの開発が必要である。

[0004] 感染症を引き起こす病原体は、従来型ワクチンで十分な効果を得ることができるClass I群病原体と、従来型ワクチン又は病原体感染歴では十分な防御免疫を獲得できないClass II群病原体とに大別される。Class II群病原体の防御が難しい理由として、それらが有する巧妙な免疫回避機構が指摘されている。HSVはClass II群病原体に分類されるが、これはHSVが免疫回避機構を有し、宿主の免疫反応を巧妙にく

ぐり抜けているからであると考えられている。HSVワクチン開発に関しては、これまでサブユニットワクチンを中心とした検討が試みられてきたが、いずれも有効性は不十分であった（非特許文献1～3）。

[0005] 病態制御のためにはCD4陽性、CD8陽性T細胞の誘導が重要であることが指摘されており、組織常在性のメモリーT細胞の誘導も重要である（非特許文献4～7）。また、弱毒生ワクチンは強力に液性免疫と細胞性免疫を誘導できることが知られている（非特許文献8～11）。

[0006] HSV-1の遺伝子Us3はプロテインキナーゼUs3をコードしており、病原性発現に重要な役割を果たしている。Us3変異体は病原性が低下することが示されており（非特許文献12～15）、培養細胞におけるウイルス増殖には必須ではないことが示されている（非特許文献16、17）。また、HSV-1のUs3はMHC-I（主要組織適合抗原クラスI）の細胞表面発現を抑制することによってCTL（細胞障害性T細胞）を回避することが示されている（非特許文献18）。

[0007] HSV-1の遺伝子UL41はRNA分解酵素VHS（virion host shut off）をコードしており、病原性発現に重要な役割を果たしている。UL41変異体は病原性が低下することが示されており（非特許文献19～23）、培養細胞の増殖には必須ではないことが示されている（非特許文献24～27）。また、HSV-1のUL41はProtein kinase R活性化の阻害、樹状細胞活性化の阻害、cGAS/STING経路活性化の阻害、炎症性サイトカイン産生の抑制などにより宿主免疫を回避することが示されている（非特許文献28～32）。

[0008] HSV-1の遺伝子UL35は、キャプシドタンパク質VP26をコードしており、病原性発現に重要な役割を果たしている。VP26変異体は病原性が低下することが示されており（非特許文献33）、培養細胞の増殖には必須ではないことが示されている（非特許文献33）。

[0009] HSV-1の遺伝子UL50は、宿主の核酸代謝酵素dUTPaseのホモログであるvdUTPaseをコードしており、病原性発現に重要な役割を果たし

ている。v d U T P a s e 変異体は病原性が低下することが示されており（非特許文献 3 4）、培養細胞の増殖には必須ではないことが示されている（非特許文献 1 5）。

[0010] HSV-1 の遺伝子 U L 2 7 は、エンベロープ糖タンパク質 B（g B）をコードしており、病原性発現に重要な役割を果たしている。g B 変異体は病原性が低下することが示されている（非特許文献 3 5）。g B は培養細胞の増殖に必須であることが示されており、g B 欠損体は増殖能を欠いているが、g B 点変異体であれば一定の増殖能を得ることができる（欠損体の非特許文献 3 6～3 9、点変異体の非特許文献 1 3、3 5）。また、HSV-1 の g B は CD1d の細胞表面発現を抑制することによって NK T 細胞の機能を阻害することが示されている（非特許文献 4 0）。

[0011] HSV-1 と HSV-2 の機能は保存されているとは限らない。例えば、U s 3 の機能は HSV-1 と HSV-2 で異なることが示されている（非特許文献 1 2）。

先行技術文献

非特許文献

- [0012] 非特許文献 1: Kim, H. C. ら、Vaccines against Genital Herpes: Where Are We? Vaccines (Basel) 2020 8:420
- 非特許文献 2: Egan, K. ら、Vaccines to prevent genital herpes. Transl Res 2020 220: 138-152
- 非特許文献 3: Truong, N. R. ら、Mechanisms of Immune Control of Mucosal HSV Infection: A Guide to Rational Vaccine Design. Front Immunol 2019 10: 373
- 非特許文献 4: Chentoufi, A. A. ら、Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. Clin Dev Immunol 2012 2012: 187585
- 非特許文献 5: Zhu, J. ら、Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-

1 acquisition. *Nat Med* 2009 15: 886-92

非特許文献6: Zhu, J. ら、Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med* 2007 204: 595-603

非特許文献7: Posavad, C. M. ら、Enrichment of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) reactive mucosal T cells in the human female genital tract. *Mucosal Immunol* 2017 10: 1259-69

非特許文献8: Lauring, A. S. ら、Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol* 2010 28: 573-9

非特許文献9: Jang, Y. H. ら、Principles underlying rational design of live attenuated influenza vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 2012 1: 35-49

非特許文献10: Cote-Gravel, J. ら、Vaccination with a live-attenuated small-colony variant improves the humoral and cell-mediated responses against *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2019 14: e0227109

非特許文献11: Zhu, J. ら、Herpes Simplex Vaccines: Prospects of Live-attenuated HSV Vaccines to Combat Genital and Ocular infections. *Curr Clin Microbiol Rep* 2015 2: 125-36

非特許文献12: Morimoto, T. ら、Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J Virol* 2009 83: 11624-34

非特許文献13: Imai, T. ら、Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *J Virol* 2010 84: 153-62

非特許文献14: Sagou, T. ら、Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J Virol* 2009 83: 5773-83

非特許文献15: Kato, A. ら、Phosphorylation of a herpes simplex virus

1 dUTPase by a viral protein kinase, Us3, dictates viral pathogenicity in the central nervous system but not at the periphery. J Virol 2014 88: 2775-85

非特許文献16 : Kato, A. ら、 Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. J Virol 2008 82: 6172-89

非特許文献17 : Gershburg, S. ら、 The UL13 and US3 Protein Kinases of Herpes Simplex Virus 1 Cooperate to Promote the Assembly and Release of Mature, Infectious Virions. PLoS One 2015 10: e0131420

非特許文献18 : Imai, T. ら、 Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8+ T cells. PLoS One 2013 8: e72050

非特許文献19 : Leib, DA. ら、 Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. J Exp Med 1999 189: 663-72

非特許文献20 : Strelow, LI. ら、 The virion host shutoff function of herpes simplex virus type 1 plays a role in corneal invasion and functions independently of the cell cycle. Virology 1997 231: 28-34

非特許文献21 : Strelow, LI. ら、 Analysis of conserved domains of UL41 of herpes simplex virus type 1 in virion host shutoff and pathogenesis. J Virol 1996 70: 5665-7

非特許文献22 : Strelow, LI. ら、 Role of the virion host shutoff (vhs) of herpes simplex virus type 1 in latency and pathogenesis. J Virol 1995 69: 6779-86

非特許文献23 : Strand, SS. ら、 Role of the VP16-binding domain of vhs in viral growth, host shutoff activity, and pathogenesis. J Virol 2004 78: 13562-72

非特許文献24 : Sciortino, MT. ら、The virion host shutoff RNase plays a key role in blocking the activation of protein kinase R in cells infected with herpes simplex virus 1. J Virol 2013 87: 3271-6

非特許文献25 : Cotter, CR. ら、The virion host shut-off (vhs) protein blocks a TLR-independent pathway of herpes simplex virus type 1 recognition in human and mouse dendritic cells. PLoS One 2010 5: e8684

非特許文献26 : Cotter, CR. ら、The virion host shutoff protein of herpes simplex virus 1 blocks the replication-independent activation of NF- κ B in dendritic cells in the absence of type I interferon signaling. J Virol 2011 85: 12662-72

非特許文献27 : Su, C. ら、Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host shutoff Protein, UL41. J Virol 2017 91: e02414-6

非特許文献28 : Suzutani, T. ら、The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. J Gen Virol 2000 81: 1763-71

非特許文献29 : Sciortino, MT. ら、The virion host shutoff RNase plays a key role in blocking the activation of protein kinase R in cells infected with herpes simplex virus 1. J Virol 2013 87: 3271-6

非特許文献30 : Cotter, CR. ら、The virion host shut-off (vhs) protein blocks a TLR-independent pathway of herpes simplex virus type 1 recognition in human and mouse dendritic cells. PLoS One 2010 5: e8684

非特許文献31 : Cotter, CR. ら、The virion host shutoff protein of herpes simplex virus 1 blocks the replication-independent activation of NF- κ B in dendritic cells in the absence of type I interferon signaling. J Virol 2011 85: 12662-72

非特許文献32 : Su, C. ら、Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff

f Protein, UL41. J Virol 2017 91: e02414-6

非特許文献33 : Kobayashi, R. ら、Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 Is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site. J Virol 2015 89: 6141-7

非特許文献34 : Kato, A. ら、Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. J Virol 2014 88: 655-66

非特許文献35 : Imai, T. ら、Role of the herpes simplex virus 1 Us3 kinase phosphorylation site and endocytosis motifs in the intracellular transport and neurovirulence of envelope glycoprotein B. J Virol 2011 85: 5003-15

非特許文献36 : Manservigi, R. ら、Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 74: 3913-7

非特許文献37 : Schaffer, PA. ら、Collaborative complementation study of temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus types 1 and 2. J Virol 1978 27: 490-504

非特許文献38 : Little, SP. ら、A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1. Virology 1981 115 : 149-60

非特許文献39 : Cai, WH. ら、Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. J Virol 1988 62: 2596-604

非特許文献40 : Rao, P. ら、Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. J Virol 2011 85: 8093-104

非特許文献41 : Da Costa, XJ. ら、Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 96: 6994-8

非特許文献42 : Shin, H. ら、A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 2012 491: 463-7

非特許文献43 : Sato, A. ら、Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol* 88: 13699-708

非特許文献44 : Shahnazaryan, D. ら、Herpes simplex virus 1 targets IRF7 via ICP0 to limit type I IFN induction. *Sci Rep* 2020 10: 22216

非特許文献45 : Zhang, L. ら、HSV-1-encoded ICP0 degrades the host deubiquitinase BRCC36 to antagonize interferon antiviral response. *Mol Immunol* 2021 135: 28-35

非特許文献46 : McMenamin, MM. ら、A gamma34.5 mutant of herpes simplex 1 causes severe inflammation in the brain. *Neuroscience* 1998 83: 1225-37

非特許文献47 : Gobeil, PA. ら、Herpes simplex virus γ 34.5 interferes with autophagosome maturation and antigen presentation in dendritic cells. *mBio* 2012 16: e00267-12

非特許文献48 : Pyles, RB. ら、Evidence that the herpes simplex virus type 1 uracil DNA glycosylase is required for efficient viral replication and latency in the murine nervous system. *J Virol* 1994 68: 4963-72

非特許文献49 : Jun, PY. ら、The UL4 gene of herpes simplex virus type 1 is dispensable for latency, reactivation and pathogenesis in mice. *J Gen Virol* 1998 79: 1603-11

非特許文献50 : Fujii, H. ら、Role of the nuclease activities encoded by herpes simplex virus 1 UL12 in viral replication and neurovirulence. *J Virol* 2014 88: 2359-64

非特許文献51 : Koyanagi, N. ら、Herpes simplex virus-1 evasion of CD8+

T cell accumulation contributes to viral encephalitis. *J Clin Invest* 2017 127: 3784–95

非特許文献52 : Jacobson, JG. ら、Importance of the herpes simplex virus UL24 gene for productive ganglionic infection in mice. *Virology* 1998 242: 161–9

非特許文献53 : Samady, L. ら、Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of vhs- HSV vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy. *J Virol* 2003 77: 3768–76

非特許文献54 : Paludan, SR. ら、Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2011 11: 143–54

非特許文献55 : Everly, DN Jr. ら、mRNA degradation by the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: genetic and biochemical evidence that Vhs is a nuclease. *J Virol* 2002 76: 8560–71

非特許文献56 : Friedman, HM. ら、Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J Virol* 1996 70:4253–60

非特許文献57 : Lubinski, JM. ら、Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *J Virol* 1998 72: 8257–63

非特許文献58 : Visalli, RJ. ら、Mutation of the herpes simplex virus 1 KOS UL45 gene reveals dose dependent effects on central nervous system growth. *Arch Virol* 2002 147: 519–32

非特許文献59 : Deschamps, T. ら、Evasion of the STING DNA-Sensing Pathway by VP11/12 of Herpes Simplex Virus 1. *J Virol* 2017 91: e00535–17

非特許文献60 : You, H. ら、Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein UL46 Inhibits TANK-Binding Kinase 1-Mediated Signaling. *mBio* 2019 10: e00919–19

非特許文献61 : Ariza, ME. ら、Human herpesviruses-encoded dUTPases: a family of proteins that modulate dendritic cell function and innate i

mmunity. *Front Microbiol* 2014 5: 504

非特許文献62 : Kato, A. ら、 Identification of a herpes simplex virus 1 gene encoding neurovirulence factor by chemical proteomics. *Nat Commun* 2020 11: 4894

非特許文献63 : Berkowitz, C. ら、 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) UL56 gene is involved in viral intraperitoneal pathogenicity to immunocompetent mice. *Arch Virol* 1994 134: 73-83

非特許文献64 : Zheng, ZQ. ら、 Herpes simplex virus protein UL56 inhibits cGAS-Mediated DNA sensing to evade antiviral immunity. *Cell Insight* 2022 1: 100014

非特許文献65 : Lu, X. ら、 The Us2 Gene Product of Herpes Simplex Virus 2 modulates NF- κ B activation by targeting TAK1. *Sci Rep* 2017 7: 8396.

非特許文献66 : Koyanagi, N. ら、 Role of herpes simplex virus 1 Us3 in viral neuroinvasiveness. *Microbiol Immunol* 2014 58: 31-7

非特許文献67 : Cabrera, JR. ら、 Secreted herpes simplex virus-2 glycoprotein G modifies NGF-TrkA signaling to attract free nerve endings to the site of infection. *PLoS Pathog* 2015 11: e1004571.

非特許文献68 : Martinez-Martin, N. ら、 Herpes simplex virus particles interact with chemokines and enhance cell migration. *J Gen Virol* 2016 97: 3007-16

非特許文献69 : Zhou, G. ら、 Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol* 2000 74: 11782-91

非特許文献70 : Jerome, KR. ら、 HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol* 2001 167: 3928-35

非特許文献71 : Kato, A. ら、Roles of Us8A and Its Phosphorylation Mediated by Us3 in Herpes Simplex Virus 1 Pathogenesis. J Virol 2016 90: 5622-35

非特許文献72 : Polcicova, K. ら、Herpes keratitis in the absence of anterograde transport of virus from sensory ganglia to the cornea. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 102: 11462-7

非特許文献73 : Jerome, KR. ら、Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. J Virol 1999 73: 8950-7

非特許文献74 : Peters, GA. ら、Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. J Virol 2002 76: 11054-64

非特許文献75 : Schust, DJ. ら、Herpes simplex virus blocks intracellular transport of HLA-G in placentally derived human cells. J Immunol 1996 157: 3375-80

非特許文献76 : Galocha, B. ら、The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH2-terminal 35 residues. J Exp Med 1997 185: 1565-72

非特許文献77 : Jugovic, P. ら、Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. J Virol 1998 72: 5076-84

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 上述したように、HSVの治療にはアシクロビル等の抗ウイルス薬が用いられている。しかし、これらの抗ウイルス薬は、ウイルスを完全に排除することができず、アドヒアランスの低下などによりウイルスが再活性化する

スクがある。そのため、HSV感染そのものを防御する予防用ワクチン或いは再発症状を軽減緩和する治療用ワクチンの開発が望まれるが、現在、有効なワクチンは存在せず、そのアンメットニーズは高い。

- [0014] 本発明は、変異導入によりHSV-2の免疫誘導能を高めるとともに高い安全性を有するHSV-2感染症の予防及び治療に利用し得る、遺伝子組換え弱毒生ワクチンを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0015] HSV-1とHSV-2の機能は保存されているとは限らないため、HSV-1に関する上記の情報を参考にHSV-2でも詳細に評価することが重要である。本発明者らは、高い有効性と安全性を併せもつ弱毒生ワクチンの開発を目指し、HSV-2の多重変異体を網羅的に作製、評価した。

- [0016] 本発明者らは、HSV-1で同定されている病原性因子および免疫回避因子について、HSV-2で同様の変異を導入することによって、安全性が高く、さらに免疫誘導能を高めた遺伝子組換え弱毒生ワクチンが構築できるという仮説に基づき、様々な変異導入ウイルスを作出し、動物実験で評価した。その結果、単純ヘルペスウイルス2型の遺伝子Us3又はUL41に変異（不活化）を導入したウイルスに対して、さらにもう1つの遺伝子に変異（不活化）を導入した下記の二重変異ウイルスはマウス性器ヘルペス初感染モデルにおいて、由来を同じくする従来のワクチンプロトタイプ弱毒生ウイルスΔTk（チミジンキナーゼ欠損）接種群に比して優れた初感染予防効果（ウイルス排出抑制効果又は発症予防効果）を示すことを見出した。なお、ΔTkは、非特許文献（非特許文献41～43）において安全性及び有効性が示唆されているため比較対象として着目したものである。ここで、例えば「Us3/UL2」の表記は、Us3とUL2の二重変異ウイルスであることを示す。

※二重変異ウイルス：

Us3/UL2、Us3/UL3、Us3/UL4、Us3/UL13、Us3/UL27、Us3/UL35、Us3/UL41、Us3/UL44

、U s 3 / U L 4 5、U s 3 / U L 4 6、U s 3 / U L 5 0、U s 3 / U L 5 6、U s 3 / U s 4、U s 3 / U s 5、U s 3 / U s 8 A、U s 3 / U s 9、U s 3 / U s 1 1
U L 4 1 / U L 4、U L 4 1 / U L 1 2、U L 4 1 / U L 1 2. 5、U L 4 1 / U L 2 4、U L 4 1 / U L 2 7、U L 4 1 / I C P 3 4. 5、U L 4 1 / U L 3 5、U L 4 1 / U L 4 3、U L 4 1 / U L 5 6、U L 4 1 / U s 2、U L 4 1 / U s 4、U L 4 1 / U s 5、U L 4 1 / U s 8 A、U L 4 1 / U s 9

[0017] さらに、上記のうちU s 3 / U L 3、U s 3 / U L 4、U s 3 / U L 2 7、U s 3 / U L 3 5、U s 3 / U L 4 4、U s 3 / U L 4 6、U s 3 / U L 5 6、U s 3 / U s 4、U s 3 / U s 5、U s 3 / U s 8 A、U L 4 1 / U L 4、U L 4 1 / U s 5は、U s 3単変異弱毒生ウイルス接種群又はU L 4 1単変異弱毒生ウイルス接種群の生存率を上回り、病原性が減弱していた。

[0018] さらに、上記のうちU s 3 / U L 2 7、U s 3 / U L 3 5、U s 3 / U s 4、U L 4 1 / U s 5は、モルモット再発モデルにおいて4 0 %以上の回帰発症予防効果を示し、このうちU s 3 / U L 3 5は8 0 %以上の回帰発症予防効果を示した。

[0019] 以上より、単純ヘルペスウイルス2型の2種類以上の遺伝子に変異（不活化）を導入することで免疫誘導能を高め、且つ病原性を減弱することで安全性を高めた遺伝子組換え弱毒生ワクチンを得ることができることを見出して、本発明を完成するに至った。

[0020] すなわち、本発明の一態様に係るウイルスは、単純ヘルペスウイルス2型（H S V - 2）の2以上の遺伝子が改変され、前記遺伝子の改変が、遺伝子機能の欠損又は低下である、多重変異型ウイルスである。

発明の効果

[0021] 本発明の一態様によれば、遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型及びこれを含むワクチンによって免疫誘導した場合、由来を同じくする従来の弱毒生ウイルスΔ T kで免疫誘導した場合に比べて、優れた初感染予防効

果を示し得る。したがって、HSV感染症に対して高い予防効果が期待できる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]実施例4のマウス初感染防御試験の模式図である。

[図2]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図3]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図4]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図5]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図6]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図7]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図8]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図9]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図10]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図11]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図12]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図13]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図14]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図15]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図16]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図17]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図18]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図19]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図20]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図21]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図22]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図23]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図24]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図25]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図26]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図27]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図28]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図29]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図30]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図31]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図32]実施例4のマウス初感染防御試験のウイルス排出抑制効果を示す図である。

[図33]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図34]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図35]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図36]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図37]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図38]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図39]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図40]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図41]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図42]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図43]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図44]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図45]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図46]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図47]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図48]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図49]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図50]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図51]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図52]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図53]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図54]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図55]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図56]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図57]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図58]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図59]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図60]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図61]実施例4のマウス初感染防御試験の病態スコアを示す図である。

[図62]実施例5のマウス脳内感染試験の模式図である。

[図63]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図64]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図65]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図66]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図67]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図68]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図69]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図70]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図71]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図72]実施例5のマウス脳内感染試験の生存率を示す図である。

[図73]実施例6のマウス経鼻感染試験の模式図である。

[図74]実施例6のマウス経鼻感染試験の生存率を示す図である。

[図75]実施例6のマウス経鼻感染試験の生存率を示す図である。

[図76]実施例6のマウス経鼻感染試験の生存率を示す図である。

[図77]実施例6のマウス経鼻感染試験の生存率を示す図である。

[図78]実施例6のマウス経鼻感染試験の生存率を示す図である。

[図79]実施例7のモルモット再発抑制試験の模式図である。

[図80]実施例7のモルモット再発抑制試験の再発抑制効果を示す図である。

[図81]実施例7のモルモット再発抑制試験の再発抑制効果を示す図である。

[図82]実施例7のモルモット再発抑制試験の再発抑制効果を示す図である。

[図83]実施例7のモルモット再発抑制試験の再発抑制効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本明細書において「A～B」とは、特に指定しない限りA以上B以下であることを示している。

[0024] 〔多重変異型ウイルス〕

本発明の一態様に係る多重変異型ウイルス（以下、「遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型」と示す場合がある）は、単純ヘルペスウイルス2型（HSV-2）の2以上の遺伝子が改変されたウイルスである。

[0025] 本明細書において、遺伝子の改変とは、遺伝子機能の欠損又は低下を指す。遺伝子機能の欠損又は低下の例として、遺伝子欠損、開始コドンの置換、開始コドンの直下への終止コドンを導入によって、標的遺伝子がコードするタンパク質が発現しないことによる遺伝子機能の欠損又は低下、遺伝子の塩基配列の変化（例えば、コーディング領域における1～数十塩基の欠失、置換又は挿入等）によるアミノ酸置換による遺伝子機能の欠損又は低下、等が挙げられる。

[0026] HSV-2は、実験室株であってもよく、臨床分離株であってもよい。

[0027] 遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型は、高免疫誘導能及び高安全性の点で、免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が改変されていることが好ましい。免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子の例として、RL1（非特許文献44、45）、RL2（非特許文献46、47）、UL2（非特許文献48）、UL3、UL4（非特許文献49）、UL12（非特許文献50）、UL12.5、UL13（非特許文献51）、UL24（非特許文献52）、UL27（点変異体の非特許文献13、35）、UL35（欠損体と点変異体の非特許文献33）、UL41（欠損体の非特許文献53、機

能をレビューした非特許文献54、点変異体の非特許論文55)、UL43、UL44(非特許文献56、57)、UL45(非特許文献58)、UL46(非特許文献59、60)、UL50(機能を報告した非特許文献61、点変異体の非特許文献62)、UL56(非特許文献63、64)、Us2(非特許文献65)、Us3(欠損体の非特許文献66、点変異体の非特許文献12、13、14、15、18)、Us4(非特許文献67、68)、Us5(非特許文献69、70)、Us8A(非特許文献71)、Us9(非特許文献72)、Us11(非特許文献73、74)、Us12(非特許文献75~77)等が挙げられる。

[0028] 遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型は、高免疫誘導能及び高安全性の点で、Us3を含む2以上の遺伝子が改変されていることがより好ましい。また、Us3及びUL2、Us3及びUL3、Us3及びUL4、Us3及びUL13、Us3及びUL27、Us3及びUL35、Us3及びUL41、Us3及びUL44、Us3及びUL45、Us3及びUL46、Us3及びUL50、Us3及びUL56、Us3及びUs4、Us3及びUs5、Us3及びUs8A、Us3及びUs9、又は、Us3及びUs11が少なくとも改変されていることがさらに好ましい。

[0029] 遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型は、高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL41を含む2以上の遺伝子が改変されていることがより好ましい。また、UL41及びUL2、UL41及びUL3、UL41及びUL4、UL41及びUL12、UL41及びUL12.5、UL41及びUL24、UL41及びUL27、UL41及びICP34.5、UL41及びUL35、UL41及びUL43、UL41及びUL56、UL41及びUs2、UL41及びUs4、UL41及びUs5、UL41及びUs8A、又は、UL41及びUs9が少なくとも改変されていることがさらに好ましい。

[0030] Us3は、プロテインキナーゼUs3をコードする遺伝子である。Us3がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号1に示される

アミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。

- [0031] 高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 3 の改変は、配列番号 1 のアミノ酸配列における 220 番目のリジン残基 (K 220) の改変であることが好ましい。
- [0032] 本明細書において、アミノ酸残基の改変とは、アミノ酸残基の欠失又は置換を指す。配列番号 1 の K 220 の改変の例として、リジン残基から、メチオニン残基への置換等が挙げられる。
- [0033] R L 1 は ICP34.5 (別名 γ 34.5) をコードする遺伝子である。R L 1 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、ICP34.5 の改変体は、ICP34.5 の発現欠失体であることが好ましい。
- [0034] U L 2 は、ウラシル DNA グリコシダーゼ U L 2 をコードする遺伝子である。U L 2 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U L 2 の改変体は、U L 2 の発現欠失体であることが好ましい。本明細書において、「発現欠失体」とは、遺伝子欠損、開始コドンの置換、開始コドンの直下に終止コドンを導入するなどにより、各遺伝子がコードするタンパク質が発現しない変異体を指す。
- [0035] U L 3 は、主に核に存在するリン酸化タンパク質 U L 3 をコードする遺伝子である。U L 3 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U L 3 の改変体は、U L 3 の発現欠失体であることが好ましい。
- [0036] U L 4 は、核に分布するウイルス粒子構成タンパク質 U L 4 をコードする遺伝子である。U L 4 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を

挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 4 の改変体は、UL 4 の発現欠失体であることが好ましい。

- [0037] UL 1 2 は、アルカリヌクレアーゼUL 1 2 をコードする遺伝子である。UL 1 2 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 1 2 の改変は、配列番号 2 のアミノ酸配列における 3 6 1 番目のチロシン残基 (Y 3 6 1) の改変であることが好ましい。配列番号 2 の Y 3 6 1 の改変の例として、チロシン残基から、フェニルアラニン残基への置換等が挙げられる。
- [0038] UL 1 2. 5 は、アルカリヌクレアーゼUL 1 2. 5 をコードする遺伝子である。UL 1 2. 5 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 1 2. 5 の改変体は、UL 1 2. 5 の発現欠失体であることが好ましい。
- [0039] UL 1 3 は、プロテインキナーゼUL 1 3 をコードする遺伝子である。UL 1 3 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 1 3 の改変は、配列番号 3 のアミノ酸配列における 1 7 6 番目のリジン残基 (K 1 7 6) の改変であることが好ましい。配列番号 3 の K 1 7 6 の改変の例として、リジン残基から、メチオニン残基への置換等が挙げられる。
- [0040] UL 2 4 は、膜に存在するウイルス粒子構成タンパク質UL 2 4 をコードする遺伝子である。UL 2 4 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2 として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 2 4 の改変体は、UL 2 4 の発現欠失体であることが好ましい。
- [0041] UL 2 7 は、糖タンパク質 g B をコードする遺伝子である。UL 2 7 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号 4 に示されるアミ

ノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 27 の改変は、配列番号4のアミノ酸配列における889番目のチロシン残基 (Y 889) の改変であることが好ましい。配列番号4のY 889の改変の例として、チロシン残基から、アラニン残基への置換等が挙げられる。

[0042] UL 35 は、キャプシドタンパク質VP 26 をコードする遺伝子である。UL 35 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号5に示されるアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 35 の改変は、配列番号5のアミノ酸配列における111番目のスレオニン残基 (T 111) の改変であることが好ましい。配列番号5のT 111の改変の例として、スレオニン残基から、アラニン残基への置換等が挙げられる。

[0043] UL 41 はRNA分解酵素 (VHS ; virion host shut off) をコードする遺伝子である。UL 41 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号6に示されるアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NC_001798.2) を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 41 の改変は、配列番号6のアミノ酸配列における215番目のアスパラギン酸残基 (D 215) の改変であることが好ましい。配列番号6のD 215の改変の例として、アスパラギン酸残基から、アスパラギン残基への置換等が挙げられる。

[0044] UL 43 は、膜タンパク質UL 43 をコードする遺伝子である。UL 43 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 43 の改変体は、UL 43 の発現欠失体であることが好ましい。

[0045] UL 44 は、糖タンパク質gCをコードする遺伝子である。UL 44 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫

誘導能及び高安全性の点で、UL 4 4 の改変体は、UL 4 4 の発現欠失体であることが好ましい。

[0046] UL 4 5 は、膜タンパク質UL 4 5 をコードする遺伝子である。UL 4 5 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 4 5 の改変体は、UL 4 5 の発現欠失体であることが好ましい。

[0047] UL 4 6 は、VP11/12をコードする遺伝子である。UL 4 6 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 4 6 の改変体は、UL 4 6 の発現欠失体であることが好ましい。

[0048] UL 5 0 は、宿主の核酸代謝酵素dUTPaseのホモログであるv d U T P a s e をコードする遺伝子である。UL 5 0 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、配列番号7に示されるアミノ酸配列（NCBI Reference Sequence: NC_001798.2）を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 5 0 の改変は、配列番号7のアミノ酸配列における97番目のアスパラギン酸残基（D 9 7）の改変であることが好ましい。配列番号7のD 9 7 の改変の例として、アスパラギン酸残基から、アラニン残基への置換等が挙げられる。

[0049] UL 5 6 は、膜タンパク質UL 5 6 をコードする遺伝子である。UL 5 6 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、UL 5 6 の改変体は、UL 5 6 の発現欠失体であることが好ましい。

[0050] U s 2 は、テグメントタンパク質U s 2 をコードする遺伝子である。U s 2 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。

。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 2 の改変体は、U s 2 の発現欠失体であることが好ましい。

[0051] U s 4 は、糖タンパク質gGをコードする遺伝子である。U s 4 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 4 の改変体は、U s 4 の発現欠失体であることが好ましい。

[0052] U s 5 は、糖タンパク質gJをコードする遺伝子である。U s 5 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 5 の改変体は、U s 5 の発現欠失体であることが好ましい。

[0053] U s 8 A は、膜タンパク質U s 8 A をコードすると予測されている遺伝子である。U s 8 A がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 8 A の改変体は、U s 8 A の発現欠失体であることが好ましい。

[0054] U s 9 は、テグメントタンパク質U s 9 をコードする遺伝子である。U s 9 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 9 の改変体は、U s 9 の発現欠失体であることが好ましい。

[0055] U s 1 1 は、テグメントタンパク質U s 1 1 をコードする遺伝子である。U s 1 1 がコードするタンパク質のアミノ酸配列の例として、NCBI Reference Sequence: NC_001798.2として登録されているアミノ酸配列を挙げることができる。高免疫誘導能及び高安全性の点で、U s 1 1 の改変体は、U s 1 1 の発現欠失体であることが好ましい。

[0056] 遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型は、培養細胞内での相同組

換えを利用することによる遺伝子改変法、cosmidを使用した遺伝子改変法、BAC (bacterial artificial chromosome) システムを使用した遺伝子改変法、等の公知の遺伝子改変法によって得ることができる。

[0057] 〔HSV-2 ワクチン〕

本発明の一態様に係るHSV-2 ワクチンは、前記遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型を抗原として含むワクチンである。当該HSV-2 ワクチンは、HSV-2 感染症の処置又は予防に使用することができる。本明細書において「HSV-2 感染症の処置又は予防」は、HSV-2 感染に関連する1つ以上の症状の緩和若しくは悪化の阻止、HSV-2 感染後の症状の発生の抑制、生体内におけるHSV-2 の細胞への感染の阻止、遅延若しくは停止、生体内におけるHSV-2 数の減少等を含む。

[0058] HSV-2 感染に関連する症状の例として、口唇ヘルペス、角膜ヘルペス、性器ヘルペス、全身性の新生児ヘルペス、並びに、HSV-2 に起因する口内炎、皮膚疾患、脳炎、髄膜炎、脊髄炎、およびHSV-2 が起因する可能性がある神経変性疾患等が挙げられる。

[0059] 本発明の一態様に係るHSV-2 ワクチンは、Us 3のみが改変されたHSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる。また、本発明の一態様に係るHSV-2 ワクチンは、UL 41のみが改変されたHSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる。

[0060] 本発明の一態様に係るHSV-2 ワクチンに含まれる前記遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型は1種であっても、2種以上であってもよい。

[0061] 本発明の一態様に係るHSV-2 ワクチンは、目的、用途、投与経路等に応じて、薬学的に許容される担体を含んでもよい。当該担体は、ワクチンの製造に通常使用される担体を使用することができる。当該担体の例として、アジュバント、溶剤、増粘剤、結合剤、着色剤、安定化剤、pH調整剤、希釈剤、賦形剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤等が挙

げられる。

[0062] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの剤形の例として、凍結乾燥剤及び真空乾燥剤等の粉末製剤、液体製剤、カプセル剤、注射剤、噴霧剤、散霧剤、坐剤、点鼻剤、等が挙げられる。ワクチン剤形としての実績、効果を発揮するメカニズムの点で、本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの好ましい剤形は注射剤、噴霧剤、点鼻剤である。

[0063] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンに含まれる前記遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型の含有量は、投与対象の種類、年齢、体重、状態、および、治療期間等により適宜決定することができる。

[0064] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンに含まれる前記遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型の用量は、安全性及び有効性の点で、 10^3 pfu $\sim 10^9$ pfuであることが好ましく、 10^4 pfu $\sim 10^8$ pfuであることがより好ましく、 10^6 pfu $\sim 10^7$ pfuであることがさらに好ましい。

[0065] (HSV-2ワクチンの投与方法／投与経路)

本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの投与方法（投与経路）は、投与対象の年齢、状態、および、治療期間等により適宜決定することができる。具体的には、経口投与または非経口投与のいずれであってもよいが、非経口投与であることが好ましい。非経口投与の投与経路の例として、静脈内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、経鼻投与、経皮投与、経直腸投与、経気道投与、経膈投与、点眼投与等が挙げられる。ワクチン剤形としての実績、効果を発揮するメカニズムの点で、本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの好ましい投与経路は、経鼻投与又は筋注投与（筋肉内投与）である。経鼻投与用のワクチンは、例えば、鼻粘膜へのワクチンの噴霧、塗布又は滴下等により、鼻粘膜を介して投与される。

[0066] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの投与対象は、HSV-2ウイルスに感染しているまたはHSV-2ウイルスに感染するおそれがある対象である。投与対象としては、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類等が挙げられ

、なかでも哺乳動物が好ましい。哺乳類としては、ヒトおよびヒト以外の動物が挙げられる。ヒト以外の動物として、ウシ、ウマ、ブタおよびヒツジ等のような家畜、ならびに、犬、猫、ラット、マウス、ハムスター、サルおよびウサギ等のような愛玩動物または実験動物が挙げられる。好ましくはヒトが挙げられる。また、鳥類としてはニワトリ、カモ、アヒル等の家禽類が挙げられる。

[0067] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンの投与回数及び投与時期は、投与対象の種類、種類、年齢、体重及び状態等により適宜決定することができる。有効性及び安全性の点で、当該HSV-2ワクチンの投与回数は1～5回であることが好ましく、1～3回であることがより好ましく、2回であることがさらに好ましい。

[0068] 本発明の一態様に係るHSV-2ワクチンを対象に投与する工程を含む、HSV-2感染症の処置又は予防する方法も本発明の一態様に含まれる。

[0069] これまで、安全性と有効性を併せもつワクチンは開発されておらず、過去の知見から強力に液性免疫と細胞性免疫を誘導できる弱毒生ワクチンの重要性が示唆されている。本発明は、遺伝子組換え技術を用いることで高い安全性と有効性をもつ弱毒生ワクチンの開発を可能にした点で革新性がある。

[0070] [ワクチンベクターとしての利用]

本発明の一態様に係る遺伝子組換え弱毒生単純ヘルペスウイルス2型はHSV-2以外の他の病原体に対するワクチンベクターとしても利用可能である。他の病原体としては例えばインフルエンザウイルス、SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) などが挙げられる。

[0071] [まとめ]

本発明の態様1に係るウイルスは、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)の2以上の遺伝子が改変され、前記遺伝子の改変が、遺伝子機能の欠損又は低下である、多重変異型ウイルスである。

[0072] 本発明の態様2に係るウイルスは、本発明の態様1において、前記2以上の遺伝子の改変が、免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子から選択される

2以上の遺伝子の改変であってもよい。

- [0073] 本発明の態様3に係るウイルスは、本発明の態様2において、前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、U s 3、UL 2、UL 3、UL 4、UL 1 2、UL 1 2 . 5、UL 1 3、UL 2 4、UL 2 7、ICP 3 4 . 5、UL 3 5、UL 4 1、UL 4 3、UL 4 4、UL 4 5、UL 4 6、UL 5 0、UL 5 6、U s 2、U s 4、U s 5、U s 8 A、U s 9、U s 1 1からなる群から選択される遺伝子であってもよい。
- [0074] 本発明の態様4に係るウイルスは、本発明の態様2又は3において、前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、U s 3を含む2以上の遺伝子であってもよい。
- [0075] 本発明の態様5に係るウイルスは、本発明の態様2～4のいずれかの態様において、前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、UL 4 1を含む2以上の遺伝子であってもよい。
- [0076] 本発明の態様6に係るウイルスは、本発明の態様4において、前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、U s 3及びUL 2、U s 3及びUL 3、U s 3及びUL 4、U s 3及びUL 1 3、U s 3及びUL 2 7、U s 3及びUL 3 5、U s 3及びUL 4 1、U s 3及びUL 4 4、U s 3及びUL 4 5、U s 3及びUL 4 6、U s 3及びUL 5 0、U s 3及びUL 5 6、U s 3及びU s 4、U s 3及びU s 5、U s 3及びU s 8 A、U s 3及びU s 9、並びに、U s 3及びU s 1 1からなる群から選択される遺伝子の組合せを含んでいてもよい。
- [0077] 本発明の態様7に係るウイルスは、本発明の態様5において、前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、UL 4 1及びUL 2、UL 4 1及びUL 3、UL 4 1及びUL 4、UL 4 1及びUL 1 2、UL 4 1及びUL 1 2 . 5、UL 4 1及びUL 2 4、UL 4 1及びUL 2 7、UL 4 1及びICP 3 4 . 5、UL 4 1及びUL 3 5、UL 4 1及びUL 4 3、UL 4 1及びUL 5 6、UL 4 1及びU s 2、UL 4 1及びU s 4、UL 4 1及びU s 5、UL 4 1及びU s 8 A、並びに、UL 4 1及びU s 9からなる群から選択さ

れる遺伝子の組合せを含んでいてもよい。

- [0078] 本発明の態様 8 に係るワクチンは、本発明の態様 1 ～ 7 のいずれかの態様のウイルスを抗原として含む、単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2）ワクチンである。
- [0079] 本発明の態様 9 に係るワクチンは、本発明の態様 8 において、Us 3 のみが改変された HSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる。
- [0080] 本発明の態様 10 に係るワクチンは、本発明の態様 8 又は 9 において、UL 41 のみが改変された HSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる。
- [0081] 本発明の態様 11 に係るワクチンは、本発明の態様 8 ～ 10 のいずれかの態様において、筋注投与用又は経鼻投与用であってもよい。
- [0082] 本発明の態様 12 に係るワクチンは、本発明の態様 8 ～ 11 のいずれかの態様において、対象に 2 回投与されてもよい。
- [0083] 本発明の態様 13 に係るワクチンは、本発明の態様 8 ～ 12 のいずれかの態様において、前記ウイルスの用量が 10^6 pfu ～ 10^7 pfu であってもよい。
- [0084] 本発明の態様 14 に係る利用は、本発明の態様 1 ～ 7 のいずれかの態様のウイルスの、単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2）以外の病原体に対するワクチンベクターとしての利用である。
- [0085] 本発明の態様 15 に係る利用は、本発明の態様 14 において、前記病原体が、インフルエンザウイルス又は SARS-CoV-2 であってもよい。
- [0086] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明の以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記

載された文献のすべてが参考として援用される。

実施例

[0087] 〔実施例1〕大腸菌内での遺伝子組換え

H S V - 2 野生型ウイルスである 1 8 6 株の遺伝子配列を含む H S V - B A C m i d 保有大腸菌（クロラムフェニコール耐性遺伝子保有）にカナマイシン耐性遺伝子を有する組み換えカセットをエレクトロポレーション法により導入した。1 m L の L B 培地中、3 2 ° C で 3 0 分間、2 0 0 r p m で振盪培養し、クロラムフェニコール及びカナマイシン含有 L B 寒天培地に菌体を塗布し、3 2 ° C で一晩培養した。

[0088] 生育したクローンより P C R を行い、目的配列が導入されたクローンを選択した。

選択したクローンを 1 m L の L B 培地中で 3 2 ° C 、 2 0 0 r p m で一晩振盪培養した。1 0 0 μ L の培養液を 2 m L のクロラムフェニコール含有 L B 培地に加え、3 2 ° C 、 2 0 0 r p m で 2 . 5 時間振盪培養した。4 0 0 μ L の 1 0 % アラビノースを加え、3 2 ° C 、 2 0 0 r p m で 1 時間振盪培養した。温浴中で 4 2 ° C 、 5 0 r p m で 3 0 分間振盪培養し、3 2 ° C 、 2 0 0 r p m で 1 . 5 時間振盪培養した。1 0 μ L の培養液を 1 m L の超純水中で希釈し、1 0 μ L の希釈液を 1 m L の超純水中で希釈後、1 5 0 μ L をクロラムフェニコール含有 L B 寒天培地に塗布し、3 2 ° C で一晩培養した。生育したクローンをクロラムフェニコール含有 L B 寒天培地、クロラムフェニコール及びカナマイシン含有 L B 寒天培地にストリークし、3 2 ° C で一晩培養した。クロラムフェニコール含有 L B 培地でのみ生育するクローンを P C R により選択した。

[0089] 〔実施例2〕B A C m i d の精製

選択したクローンを 2 0 0 m L のクロラムフェニコール含有 L B 培地に植菌し、3 2 ° C 、 2 0 0 r p m で一晩培養した。4 ° C 、 7 0 0 0 r p m で 5 分間遠心し、上清を除いた。ペレットを 5 m L の S o l l l （0 . 9 % D - グルコース、2 5 m M T r i s - H C l （p H 8 . 0 ） 、 1 0 m M E D T A ）で懸濁し、1 0 m L の S o l l l l （0 . 1 % S D S 、 0 . 2 N N a O H

）を加えた。転倒混和後、室温で10分間インキュベートした。7.5 mLのS o l l l l (29.43%酢酸カリウム、11.5%氷酢酸)を加え、転倒混和した。4℃、15000 rpmで20分間遠心し、上清をろ過した。0.6倍量の2-プロパノールを加え、転倒混和した。4℃、5000 rpmで5分間遠心し、上清を除いた。ペレットを4 mLのTE (T r i s - E D T A)で懸濁し、5.4 gの塩化セシウムを加えた。180 μLの10 mg/mL臭化エチジウム溶液を加え、20℃、70000 rpmで一晩超遠心した。

[0090] 超遠心によりできたバンドのうち、目的のバンドを18 Gの注射針を付けた1 mLシリンジで回収し、等量の99.5%エタノールを加えた。転倒混和後、4℃、15000 rpmで2分間遠心し、上清を除いた。ペレットを400 μLのTEで懸濁し、500 μLのフェノール：クロロホルム等量混合液を加えた。転倒混和後、4℃、15000 rpmで3分間遠心した。水層を新しいチューブに移し、同様の工程を行い、水層を新しいチューブに移した。等量のジエチルエーテルを加え、転倒混和後、4℃、15000 rpmで3分間遠心した。エーテル層を除き、同様の工程を3回行った。エーテル層を除き、40 μLの3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2)、1 mLの99.5%エタノールを加え、転倒混和した。4℃、15000 rpmで10分間遠心し、上清を除いた。1 mLの70%エタノールを加え、転倒混和後、4℃、15000 rpmで2分間遠心し、上清を除いた。再度、同条件で遠心し、上清を除いた。

[0091] [実施例3] R a b b i t s k i n c e l l 内でのウイルス再構築
250 μLの滅菌超純水で懸濁し、35 μLの2.2 M塩化カルシウム溶液を加え、タッピングで混和した。250 μLの2×HBS (1.6%塩化ナトリウム、0.074%塩化カリウム、0.027%リン酸水素ナトリウム・2水和物、0.2%デキストロース、1%HEPES (pH 7.05))を加え、タッピングで混和した (DNA溶液)。10分後にT-25フラスコで培養しているウサギ皮膚細胞から培地を除き、5 mLのPBSで洗浄

した。5 mLの0.04%DEAE・デキストランを加え、37℃、5%CO₂下で10分間インキュベートした。DEAE・デキストランを除き、5 mLのTEN(0.2M塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl(pH 8.0)、2mM EDTA)を加え、除いた。5 mLの5%FCS含有DMEM培地を加え、DNA溶液を添加した。4時間後に培地を除き、5 mLの5%FCS含有DMEM培地を加え、除いた。5 mLの5%FCS含有DMEMを加え、37℃、5%CO₂下で一晩インキュベートした。培地を除き、5 mLの199V培地を加え、37℃、5%CO₂下でインキュベートした。

[0092] ウイルス産生の指標として、プラークの有無を観察した。ウイルス産生が確認できたら、適切なタイミングでVero細胞に感染させ、拡張培養した。プラークアッセイにより、ウイルス力価を測定した。得られたウイルスを抗原とする「遺伝子組換え弱毒生ワクチン」(以下「HSV-2ワクチン」)を作製し、実験に使用した。

[0093] [実施例4] マウス初感染防御試験

マウスに 1×10^4 pfuのHSV-2ワクチンを経鼻接種した。3週間後、8.35 mg/mLのDepo-Gestinを皮下投与した。1週間後、HSV-2野生型の186株を 1×10^3 pfu経膣チャレンジした。2週間、膣の病変スコアを評価し、また、膣洗浄液を回収し、プラークアッセイにより、ウイルス力価を測定した。膣病変スコアは、0:症状なし、1:性器のわずかな紅斑、浮腫、2:性器の脱毛、紅斑、浮腫、3:性器の著しい脱毛、紅斑、浮腫、4:後肢麻痺、5:死亡として評価した。

[0094] マウス初感染防御試験の模式図を図1示す。下記の二重変異ウイルスを抗原とするHSV-2ワクチンが、由来を同じくする従来のワクチンプロトタイプ弱毒生ウイルスである ΔTk 接種群よりも、ウイルス排出を抑制していた(図2~図32)。なお、図中「Us3KM」とは、Us3の220番目のリジンをメチオニンに変換したウイルス、「UL13KM」は、UL13の173番目のリジンをメチオニンに変換したウイルス、「UL27YA」

は、UL 27の889番目のチロシンをアラニンに変換したウイルス、「UL 35TA」は、UL 35の111番目のスレオニンをアラニンに変換したウイルス、「UL 41DN」は、UL 41の215番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変換したウイルス、「UL 50DA」は、UL 50の97番目のアスパラギン酸をアラニンに変換したウイルス、「UL 12YF」は、UL 12の376番目のチロシンをフェニルアラニンに変換したウイルスを意味する。また、例えば「ΔUL 2」のようにΔを付した表記は、当該遺伝子が欠損し、当該遺伝子がコードするタンパク質が発現しないウイルスを意味する。

※二重変異ウイルス：

Us 3/UL 2、Us 3/UL 3、Us 3/UL 4、Us 3/UL 13、Us 3/UL 27、Us 3/UL 35、Us 3/UL 41、Us 3/UL 44、Us 3/UL 45、Us 3/UL 46、Us 3/UL 50、Us 3/UL 56、Us 3/Us 4、Us 3/Us 8A、Us 3/Us 9、Us 3/Us 11、UL 41/UL 2、UL 41/UL 3、UL 41/UL 4、UL 41/UL 12、UL 41/UL 12. 5、UL 41/UL 24、UL 41/UL 27、UL 41/ICP 34. 5、UL 41/UL 35、UL 41/UL 43、UL 41/UL 56、UL 41/Us 2、UL 41/Us 4、UL 41/Us 5、UL 41/Us 8A、UL 41/Us 9

[0095] 膣の病変症状に関して、下記の二重変異ウイルスを抗原とするHSV-2ワクチンはΔTk接種群と比して顕著に低減されており、良好な発症防御効果を示した（図33～図61）。

※二重変異ウイルス：Us 3/UL 2、Us 3/UL 3、Us 3/UL 4、Us 3/UL 13、Us 3/UL 27、Us 3/UL 35、Us 3/UL 41、Us 3/UL 45、Us 3/UL 50、Us 3/UL 56、Us 3/Us 4、Us 3/Us 8A、Us 3/Us 9、Us 3/Us 11、UL 41/UL 2、UL 41/UL 3、UL 41/UL 4、UL 41/UL 12、UL 41/UL 12. 5、UL 41/UL 24、UL 41/UL 27、UL 41

／ICP34.5、UL41／UL35、UL41／UL43、UL41／
UL56、UL41／Us2、UL41／Us4、UL41／Us5、UL
41／Us9

[0096] 〔実施例5〕マウス脳内感染試験

マウスに 1×10^4 p f uのHSV-2ワクチンを脳内接種した。2週間、生存率を観察した。

[0097] マウス脳内感染試験の模式図を図62に示す。Us3／UL3、Us3／UL4、Us3／UL27、Us3／UL35、Us3／UL44、Us3／UL46、Us3／UL56、Us3／Us4、Us3／Us5及びUs3／Us8Aを抗原とするHSV-2ワクチンを投与した後の生存率は、Us3単変異弱毒生ウイルス接種群を上回り、病原性が減弱していることが確認された（図63～72）。

[0098] 〔実施例6〕マウス経鼻感染試験

マウスに 1×10^5 p f uのHSV-2ワクチンを経鼻接種した。2週間、生存率を観察した。

[0099] マウス経鼻感染試験の模式図を図73に示す。Us3／UL3、Us3／UL56、Us3／Us4、UL41／UL4及びUL41／Us5を抗原とするHSV-2ワクチンを投与した後の生存率はUs3単変異弱毒生ウイルス又はUL41単変異弱毒生ウイルス接種群を上回り、病原性が減弱していることが確認された（図74～図78）。

[0100] 〔実施例7〕モルモット再発抑制試験

モルモットに 1×10^5 p f uのHSV-2野生型ウイルスMS株を経膣チャレンジした。2週間後、 1×10^6 p f u又は 1×10^7 p f uのHSV-2ワクチンを経鼻接種又は筋注した（prime接種）。2週間後、同量のHSV-2ワクチンを経鼻接種又は筋注した（boost接種）。prime接種から最大で7週間、膣における水疱の有無を観察した。水疱が別の場所に新たに発生した場合に、再発（回帰発症）ありとした。

[0101] モルモット再発抑制試験の模式図を図79に示す。2回接種（prime

接種及びb o o s t 接種) することで、U s 3 / U L 2 7、U s 3 / U L 3 5、U s 3 / U s 4 及びU L 4 1 / U s 5 を抗原とするH S V - 2 ワクチンは4 0 % 以上の回帰発症予防効果を示し、U s 3 / U L 3 5 は8 0 % 以上の回帰発症予防効果を示した (図 8 0 ~ 図 8 3) 。

産業上の利用可能性

[0102] 本発明の単純ヘルペスウイルス2型の2種類の遺伝子に変異を導入したH S V - 2 ワクチンは、高い安全性と有効性を併せもつワクチンとして産業上の利用が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 単純ヘルペスウイルス2型（HSV-2）の2以上の遺伝子が改変され、
前記遺伝子の改変が、遺伝子機能の欠損又は低下である、多重変異型ウイルス。
- [請求項2] 前記2以上の遺伝子の改変が、免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子から選択される2以上の遺伝子の改変である、請求項1に記載のウイルス。
- [請求項3] 前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、Us3、UL2、UL3、UL4、UL12、UL12.5、UL13、UL24、UL27、ICP34.5、UL35、UL41、UL43、UL44、UL45、UL46、UL50、UL56、Us2、Us4、Us5、Us8A、Us9、Us11からなる群から選択される遺伝子である、請求項2に記載のウイルス。
- [請求項4] 前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、Us3を含む2以上の遺伝子である、請求項3に記載のウイルス。
- [請求項5] 前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、UL41を含む2以上の遺伝子である、請求項3に記載のウイルス。
- [請求項6] 前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、Us3及びUL2、Us3及びUL3、Us3及びUL4、Us3及びUL13、Us3及びUL27、Us3及びUL35、Us3及びUL41、Us3及びUL44、Us3及びUL45、Us3及びUL46、Us3及びUL50、Us3及びUL56、Us3及びUs4、Us3及びUs5、Us3及びUs8A、Us3及びUs9、並びに、Us3及びUs11からなる群から選択される遺伝子の組合せを含む、請求項4に記載のウイルス。
- [請求項7] 前記免疫原性又は免疫逃避に関連する遺伝子が、UL41及びUL2、UL41及びUL3、UL41及びUL4、UL41及びUL1

2、UL 4 1 及び UL 1 2、5、UL 4 1 及び UL 2 4、UL 4 1 及び UL 2 7、UL 4 1 及び ICP 3 4、5、UL 4 1 及び UL 3 5、UL 4 1 及び UL 4 3、UL 4 1 及び UL 5 6、UL 4 1 及び Us 2、UL 4 1 及び Us 4、UL 4 1 及び Us 5、UL 4 1 及び Us 8 A、並びに、UL 4 1 及び Us 9 からなる群から選択される遺伝子の組合せを含む、請求項 5 に記載のウイルス。

- [請求項8] 請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウイルスを抗原として含む、単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2）ワクチン。
- [請求項9] Us 3 のみが改変された HSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる、請求項 8 に記載のワクチン。
- [請求項10] UL 4 1 のみが改変された HSV-2 を抗原として含むワクチンと比較して安全性又は有効性が優れる、請求項 8 に記載のワクチン。
- [請求項11] 筋注投与用又は経鼻投与用である、請求項 8 に記載のワクチン。
- [請求項12] 対象に 2 回投与されるものである、請求項 8 に記載のワクチン。
- [請求項13] 前記ウイルスの用量が 10^6 pfu ～ 10^7 pfu である、請求項 8 に記載のワクチン。
- [請求項14] 請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウイルスの、単純ヘルペスウイルス 2 型（HSV-2）以外の病原体に対するワクチンベクターとしての利用。
- [請求項15] 前記病原体が、インフルエンザウイルス又は SARS-CoV-2 である、請求項 1 4 に記載のワクチンベクターとしての利用。